



## 论文

# BFAR 与 p75NTR 的蛋白相互作用抑制 p75NTR 信号转导

李红梅, 施慧莉, 霍克克\*

复旦大学生命科学学院, 遗传工程国家重点实验室, 上海 200433

\* 联系人, E-mail: kkhuo@fudan.edu.cn

收稿日期: 2011-10-18; 接受日期: 2011-11-07

国家高技术研究发展计划(批准号: 2006AA02A310)、国家科技重大专项(批准号: 2008ZX10003-006, 2009ZX09301-011)和国家重大科学研究计划(批准号: 2010CB912603)资助项目

**摘要** p75NTR 是低亲和力的神经生长因子受体, 能与高亲和力受体 TrkA 协同作用促进细胞增殖, 也能与细胞内配体结合介导死亡信号通路, 诱导细胞凋亡. 为了探讨 p75NTR 功能的调控机制, 本文利用膜蛋白酵母双杂交技术从人胎脑 cDNA 文库中筛选到一个新的 p75NTR 相互作用蛋白——BFAR. 通过对酵母的共转化、GST pull-down 和免疫共沉淀实验, 证实了 p75NTR 与 BFAR 蛋白在体内外相互作用的特异性. 荧光共定位实验发现, 两者可共定位于细胞质中. 此外, 荧光素酶检测实验表明, 共转染 p75NTR 和 BFAR 能够抑制 p75NTR 介导的 NF $\kappa$ B 和 JNK 信号通路. 细胞周期实验发现, BFAR 在 PC-12 细胞和 HEK293T 细胞中的高表达使细胞周期中的 G2/M 期细胞数增加, S 期细胞数量减少, 而 G0/G1 期细胞数无显著差异.

**关键词**p75NTR  
BFAR  
膜蛋白酵母双杂交  
蛋白质相互作用  
细胞凋亡

神经生长因子(nerve growth factor, NGF)是神经营养因子家族成员之一, 通过与特异的靶细胞表面受体结合维持神经系统的正常生物学功能. NGF 主要有 2 类受体: 高亲和力的酪氨酸激酶受体 TrkA 和低亲和力受体 p75NTR(p75 neurotrophin receptor). 其中, p75NTR 基因位于 17q12~17q22, 它编码一种 75 kD 的 I 型单链跨膜糖蛋白, 包含了信号肽、胞外区、跨膜区及胞内区 4 个结构区域. 其中胞外区由 4 个高度保守的 Cys 富集结构域组成, 是配体结合位点. 胞内区至少含有 3 个结构域: 近膜区、II 型死亡结构域、突触后密度蛋白结合结构域. 近膜区中有一段 29 个氨基酸的序列——chopper 结构域是介导神经元凋亡作

用所必需的<sup>[1]</sup>.

p75NTR 与神经生长因子构成的信号通路对于确保神经系统的正常发育及维持神经系统的健康具有重要作用. 目前, 对于该通路的生物学效应和调控机制还不是十分清楚, 对该信号通路的深入研究将有助于阐明某些神经系统病变的机理. 在利用分裂的泛素化膜蛋白酵母双杂交技术筛选与 p75NTR 相互作用蛋白的过程中获得了包括双功能凋亡调节子(bifunctional apoptosis regulator, BFAR)在内的一系列相互作用蛋白. 本文主要报道了对 p75NTR 和 BFAR 之间蛋白相互作用的发现、验证, 以及两者相互作用对于细胞功能影响的初步研究结果.

## 1 材料与方法

### 1.1 材料

DUAL Membrane System 膜蛋白酵母双杂交系统、人胎脑 cDNA 文库、HTX  $\beta$ -galactosidase Assay kit 均购自瑞士 DUALsystems Biotech 公司. 限制性内切酶购自 NEB 公司; T4 DNA 连接酶, DNA marker 购自 TaKaRa 公司; *Pfu* 酶、*Taq* 酶、鲑鱼精单链 DNA (ssDNA) 购自北京博大泰克生物技术公司; PCR 产物纯化试剂盒、DNA 片段回收试剂盒、Plasmid 抽提试剂盒购自 Axygen 生物技术有限公司. 3-氨基-1,2,4-三氮唑(3-AT)购自 Sigma & Aldrich 公司; IPTG, Protease Inhibitor Cocktails 和 PMSF 均为 Amresco 公司产品; Ni-NTA Agrose 珠子购自 QIAGEN 公司, Glutathione Sepharose 4B 购自 Pharmacia Biotech 公司.

培养细胞所用的 DMEM 高糖液体培养基、胎牛血清为 Hyclone 公司产品; 胰酶 Trypsin-EDTA, opti-DMEM 为 GIBCO 公司产品. 转染试剂 Lipofectamin™ 2000 为 Invitrogen 公司产品; Protein A+G beads、鼠抗 Myc、鼠抗 Flag 的单克隆抗体均购自 Sigma & Aldrich 公司; 兔抗 p75NTR 的单克隆抗体购自 Abcam 公司; HRP 交联的羊抗兔二抗、Cy3 交联兔抗鼠红色荧光二抗购于 ProteinTech 公司; HRP 交联的兔抗鼠二抗购自 Rockland 公司; 化学发光底物检测系统(SuperSigna West Femto Maximum Sensitivity Substrate)购自 Pierce 公司; RNA 酶 A 购自经科宏达生物技术有限公司; PI 购自上海凯基生物公司; Dual luciferase reporter assay system 是 Promega 公司产品.

用于构建质粒的 pMT18-T 载体购于 TaKaRa 公司; 原核细胞表达载体 pGEX-5X-1 来自 Pharmacia Biotech, pET-28a 载体来自 Novagen 公司; 哺乳动物表达载体 pEF-Flag 和 pCMV-Myc 购自美国 Invitrogen 公司、pEGFP-C1 载体购自 Clontech 公司. 所用载体经过多克隆位点改造的名称前端标记加 N. 用于转化的大肠杆菌菌株 TOP10 和表达菌株 BL21, BL21(DE3), 哺乳动物细胞系 HEK293T 细胞株、HeLa 细胞株、PC-12 细胞株均为本实验室保存. 引物由赛百盛公司合成.

### 1.2 *p75NTR* 基因的克隆

根据 Ensembl 和 GenBank(登录号: NM\_002507) 的基因注释 *p75NTR* 基因全长 3417 bp, CDS 全长

1284 bp, 编码 427 个氨基酸, 共含 6 个外显子, 其中第一个外显子是信号肽序列, 长度为 66 个氨基酸. 从一株人肝癌细胞株 SMMC7721 基因组 DNA 中通过逐一扩增外显子的方法, 设计合成特异性基因引物, PCR 拼接得到 *p75NTR* 基因全长片段. 扩增 6 个外显子的引物序列如下: Exon1F: 5'-AGAGGCCATTA-CGGCCATGGGGCAGGTGCCAC-3', Exon1R: 5'-GCACTCACCGCTGTGTGTGTACAG-3'; Exon2F: 5'-CAAGGCCATTACGGCCAAGGAGGCATGCCCCAC-3', Exon2R: 5'-CAGAGAATGTACACTGTCCAGG-CAGGGCTC-3'; Exon3F: 5'-AGTGTGACATTCTCT-GACGTGGTGA-3', Exon3R: 5'-CCTCGCACTCGGC-GTCGG-3'; Exon4F: 5'-CCGACGCCGAGTGCAGG-AGATCCCTGGCCGTTG-3', Exon4R: 5'-TGTTCCA-CCTTTGAAGGCTATGTAG-3'; Exon5F: 5'-TCGA-ATTCAAGAGGTGGAACAGCTGCAAGCAGAA-3', Exon5R: 5'-CTTGAGGGCCTGTCCGAGGCTGTCT-3'; Exon6F: 5'-GGACAGGCCCTCAAGGGTGACG-3', Exon6R: 5'-AGAGGCCGAGGCGGCCTCACACCGG-GGATGTGG-3'.

### 1.3 膜蛋白酵母双杂交筛选 *p75NTR* 相互作用蛋白

采用瑞士 Dualsystems Biotech 公司的 Dual Membrane System 膜蛋白酵母双杂交系统及人胎脑 cDNA 文库, 参照该系统的标准操作手册进行. 将 *p75NTR* 基因克隆到 pBT3-SUC 载体上作为“诱饵”, 先对 *p75NTR* 基因进行自激活检测、功能验证和筛选条件测试, 再用以筛选人胎脑 cDNA 文库.

### 1.4 GST pull-down 实验

将诱饵基因 *p75NTR* 构建到表达载体上, 转化大肠杆菌 BL21 并获得转化子. pGEX-5X-1-*p75NTR* 转化子克隆经 100  $\mu$ mol/L IPTG 在 28 $^{\circ}$ C 诱导培养 2 h, 离心收集菌体, 2 mL PBS 重悬细胞, 超声破碎细胞壁, 破壁前加入 PMSF 和蛋白酶抑制剂, 破壁后立即加入 100  $\mu$ L 20% Triton X-100 溶解蛋白, 冰上放置 30 min, 用 Glutathione Sepharose 4B 珠子结合沉淀细胞裂解液上清中的 GST 融合表达蛋白. 同时, 将酵母双杂交筛选到的猎物基因全长构建到 pET-28a 融合蛋白表达质粒, 转化大肠杆菌 BL21(DE3) 并获得转化子. 100  $\mu$ mol/L IPTG 在 22 $^{\circ}$ C 诱导表达 6 h 后收集菌体, 2 mL 裂解缓冲液(50 mmol/L  $\text{NaH}_2\text{PO}_4$ , 300 mmol/L NaCl, 10 mmol/L 咪唑, pH 8.0)重悬细胞, 超声破壁后

用 Ni-NTA Agrose 珠子纯化裂解液上清中的蛋白, 200  $\mu$ L 洗涤缓冲液(50 mmol/L  $\text{NaH}_2\text{PO}_4$ , 300 mmol/L NaCl, 20 mmol/L 咪唑, pH 8.0)洗涤珠子 3 次, 再用 60  $\mu$ L 洗脱缓冲液(50 mmol/L  $\text{NaH}_2\text{PO}_4$ , 300 mmol/L NaCl, 250 mmol/L 咪唑, pH 8.0)洗脱得到纯化的 His-猎物蛋白。

将结合有 GST-p75NTR 融合蛋白的 Glutathione Sepharose 4B 悬浮在 500  $\mu$ L NETN 缓冲液(100 mmol/L NaCl, 1 mmol/L EDTA, 20 mmol/L Tris-HCl, 0.5% Nonidet P-40, 1 mmol/L PMSF, pH 7.0)中, 加入 20  $\mu$ L 纯化好的 His-猎物融合蛋白, 4 $^\circ$ C 结合 4~8 h, 沉淀用 buffer H(20 mmol/L HEPES, 50 mmol/L KCl, 20% 甘油, 0.1% Nonidet P-40, 0.007%  $\beta$ -巯基乙醇, pH 7.7)洗涤 3 次, 在沉淀中加入适量蛋白电泳缓冲液, 100 $^\circ$ C 变性 10 min, 以 anti-His 的单克隆抗体进行 Western blot 检测。

### 1.5 免疫共沉淀实验

将 p75NTR 构建到 pEF-Flag 表达载体上, 猎物基因构建在 pCMV-Myc 载体上, 采用脂质体 Lipofectamin<sup>TM</sup> 2000 转染 PC-12 细胞, 经 37 $^\circ$ C, 5%  $\text{CO}_2$  培养 36~48 h 后收获细胞。用预冷的 PBS 润洗贴壁细胞 1 次, 细胞裂解液裂解细胞, 4 $^\circ$ C, 12000 $\times$ g 离心 15 min, 吸取 40  $\mu$ L 细胞裂解上清, 加入 5 $\times$ SDS 上样缓冲液, 100 $^\circ$ C 变性 10 min。先进行 Western blot, 用以检测被转染质粒在宿主细胞中的表达情况。

然后, 向得到的细胞裂解物中加入 10  $\mu$ L 50% protein A+G beads 悬液, 混匀后置于 4 $^\circ$ C 振荡 1 h 进行预沉淀。4 $^\circ$ C, 1000 $\times$ g 离心 5 min。吸取上清液, 加入一抗(为需要免疫沉淀蛋白的相应抗体) 2  $\mu$ g, 4 $^\circ$ C 振荡 1 h, 再加入 20  $\mu$ L 50% protein A+G beads 悬液, 混匀后置于 4 $^\circ$ C 振荡过夜。用预冷的 1 $\times$ PBS 清洗 3 次, 将沉淀进行蛋白电泳, 用 anti-Myc 和 anti-p75NTR 抗体进行 Western blot 检测。

### 1.6 免疫荧光共定位实验

将猎物基因克隆入 pEGFP-C1 载体中, 与 pEF-Flag-p75NTR 一起瞬时共转染 HeLa 细胞, 培养 24~36 h, 弃去培养液, 用 4% 甲醇溶液固定细胞 1 h, 1% Triton X-100 通透 10 min, 1% BSA 封闭 1 h, 再用兔抗 p75NTR 抗体结合过夜。经 1 $\times$ PBST 洗涤 5 次后, 加入羊抗兔 Cy3 偶联荧光二抗室温结合 1 h,

用 Hoechst 3342 染色液进行核染色, 室温避光反应 10 min, 封片。在荧光共聚焦显微镜下观察细胞内蛋白的定位情况, 其中融合绿色荧光蛋白的观测波长为 480 nm, 融合红色荧光蛋白的观测波长为 568 nm。

### 1.7 荧光素酶报告基因检测细胞信号通路

细胞用 0.05% 的胰酶消化, 转接 24 孔板, 细胞密度约为  $2 \times 10^5$  个/mL, 于 37 $^\circ$ C 5%  $\text{CO}_2$  培养过夜。将信号通路报告质粒(p53-luc, NF $\kappa$ B-luc, CRE-luc, SRE-luc, AP1-luc)和 Rellina 内参质粒分别与目的基因质粒或空载对照质粒共转染细胞。于 37 $^\circ$ C, 5%  $\text{CO}_2$  培养箱中培养 48 h, PLB 裂解细胞, 收集裂解液上清用冷光仪测定相对荧光素酶活性读数。按照 Promega 公司 Dual luciferase reporter assay system 手册进行操作, 每个检测加 5  $\mu$ L 细胞裂解上清样品, 每孔先加 25  $\mu$ L LAR II 测定 Firefly luciferase 活性, 再加 25  $\mu$ L Stop&Glo 底物液, 以测定 Rellina luciferase 活性。每个样品平行做 3 个复孔。

### 1.8 流式细胞仪测定细胞周期

0.05% 胰酶消化细胞, PBS 洗涤 2 次, 离心弃上清, 加入 1 mL 冰预冷 75% 乙醇, 4 $^\circ$ C 固定过夜。500 $\times$ g 离心 5 min, PBS 洗涤 2 次, 加入 400  $\mu$ L PBS 重悬细胞, 再加入 4  $\mu$ L 碘化丙啶(1 mg/mL)和 10  $\mu$ L RNase A(10 mg/mL), 轻轻弹匀, 室温避光反应 10 min。200 目尼龙网过滤, 上机(FACS)做 DNA 细胞周期采样分析, 每个实验重复 3 次。

## 2 结果

### 2.1 膜蛋白酵母双杂交筛选及回转变验证结果

因 p75NTR 属于 I 型膜蛋白, 选用 Dual Membrane System 膜蛋白酵母双杂交系统来筛选其相互作用蛋白, 首先需要对 p75NTR 的自激活和功能情况进行检测。将构建好的诱饵克隆质粒 pBT3-SUC-p75NTR 先分别与 pOst1-NubI 和 pPR3-N 共转化入酵母菌株 NMY51; 同时转化 pTSU2-APP 和 pNubG-Fe65 做为阳性对照, pTSU2-APP 和 pPR3-N 为阴性对照。转化液分别涂布 SD-Trp-Leu, SD-Trp-Leu-His, SD-Trp-Leu-His-Ade 3 种不同营养缺陷型选择培养基平板。结果显示, bait 质粒与空载体 pPR3-N 共转均不能在

SD-Trp-Leu-His, SD-Trp-Leu-His-Ade 筛选板上生长(表 1), 表明 p75NTR 不存在自激活现象. 另外在功能检查筛选板中, 发现只有 pBT3-SUC-p75NTR 和 pOst1-NubI 共转化的 SD-Trp-Leu-His, SD-Trp-Leu-His-Ade 筛选板上有克隆生长(表 1), 表明 pBT3-SUC-p75NTR 能够与野生型 Nub 载体 pOst1-NubI 互补形成有功能的泛素分子激活报告基因 *His*, *Ade*. 通过进行文库筛选压力测试, 确定了合适的筛库条件为 SD-Trp-Leu-His-Ade+1 mmol/L 3-AT. 然后用诱饵克隆质粒 pBT3-SUC-p75NTR 对 Dual system 公司的人胎脑 cDNA 文库进行筛选, 筛库效率为  $3.9 \times 10^5$  个克隆数/ $\mu\text{g}$  文库质粒, 达到筛库要求. 筛选板上长出的克隆子, 采用 HTX  $\beta$ -galactosidase assay kit 进行 *LacZ* 报告基因检测. 抽提筛库获得的阳性克隆酵母质粒并测定 DNA 序列, 通过 NCBI BLAST 分析比对, 排除重复序列和非蛋白编码序列, 剔除假阳性克隆, 最终得到包括 BFAR 在内的 38 个编码基因阳性克隆. 将 pPR3-N-BFAR 质粒转入已含有 pBT3-SUC-p75NTR 的 NMY51 酵母菌株中进行回转验证, 结果表明 p75NTR 与 BFAR 蛋白在酵母内的确能发生相互作用并激活 *LacZ* 报告基因(图 1).

表 1 p75NTR 功能检查<sup>a)</sup>

自激活检测及功能验证	SD-TL	SD-3	SD-4
pBT3-SUC-p75NTR/pOst1-NubI	810	151	64
pBT3-SUC-p75NTR/pPR3-N	809	1	2
PTSU2/pNubG-Fe65(+)	670	400	350
PTSU2/pPR3-N(-)	650	2	0

a) p75NTR 自激活检测及功能验证结果, 表中数值为各筛选条件平板上长出的克隆个数. 其中 SD-TL, SD-3 和 SD-4 分别代表 SD-Trp-Leu, SD-Trp-Leu-His 和 SD-Trp-Leu-His-Ade 筛选条件

## 2.2 p75NTR 与 BFAR 在体外直接相互作用

为了排除酵母细胞内假阳性因素的影响, 采用 GST pull-down 实验验证 p75NTR 与 BFAR 在体外条件下的蛋白相互作用. 首先, 通过构建原核表达质粒 pGEX-5X-1-p75NTR 和 pET-28a-BFAR, 分别转化大肠杆菌 BL21 或 BL21(DE3)进行表达并获得纯化的融合蛋白; 然后, 在纯化好的 GST-p75NTR 和 GST 珠子中加入等量的纯化 His-BFAR 蛋白进行体外结合, 珠子经洗涤后用 anti-His 抗体进行 Western blot 检测. 结果如图 2 所示, 当有 GST-p75NTR 存在

时可以检测到 His-BFAR 的条带(图 2, 泳道 3 和 4), 而仅有 GST 存在时检测不到 His-BFAR 的条带(图 2, 泳道 2), 表明 p75NTR 与 BFAR 在体外发生了特异性相互作用.

## 2.3 p75NTR 与 BFAR 在细胞内直接相互作用

为了检测 p75NTR 与 BFAR 是否在细胞环境内真实存在相互作用, 通过构建真核表达质粒并将 pEF-Flag-p75NTR 分别与 pCMV-Myc-BFAR 或 pCMV-Myc 空质粒共转染 PC-12 细胞, 进行免疫共沉淀实验. 结果如图 3 所示, 当 pEF-Flag-p75NTR 与 pCMV-Myc-BFAR 共转染时, 结合有 BFAR 的珠子可以将 Flag-p75NTR 免疫共沉淀下来, 从而被 anti-

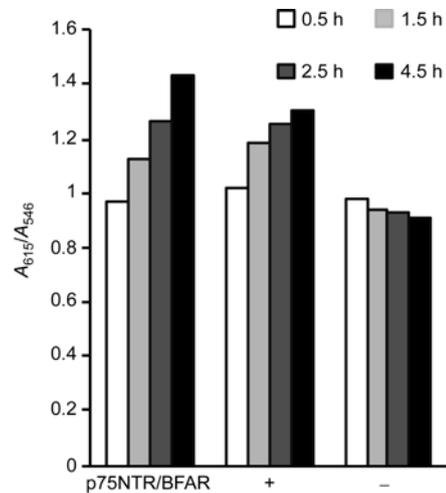


图 1 p75NTR 与 BFAR 回转验证

*LacZ* 报告基因检测结果, 采用  $\beta$ -galactosidase 活性检测方法进行检测, 菌液与反应液混合均匀后, 酶标仪测定  $A_{615}$  和  $A_{546}$ , 通过计算两者的比值来定性判断是否可以激活 *LacZ* 基因. 其中比值大于 1 为阳性, 即两者间存在相互作用并激活 *LacZ*; 比值小于 1 为阴性. 图示为反应 0.5, 1.5, 2.5 和 4.5 h 时  $A_{615}$  和  $A_{546}$  比值

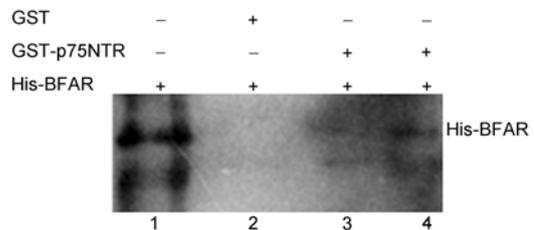


图 2 p75NTR 与 BFAR 体外蛋白互作验证结果

泳道 1: pET-28a-BFAR 表达纯化产物; 泳道 2: pGEX-5X-1 空载和 pET-28a-BFAR 表达产物; 泳道 3 和 4: pGEX-5X-1-p75NTR 和 pET-28a-BFAR 表达产物

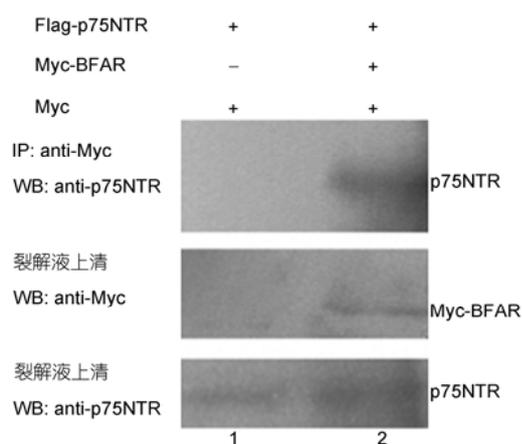


图3 p75NTR 和 BFAR 在 PC-12 细胞中存在特异性相互作用

泳道 1: pEF-Flag-p75NTR 和 pCMV-Myc 空载体共转染; 泳道 2: pEF-Flag-p75NTR 和 pCMV-Myc-BFAR 共转染

p75NTR 抗体检测到(图 3, 泳道 2). 而在 pEF-Flag-p75NTR 与 pCMV-Myc 共转染的阴性对照中, Flag-p75NTR 不会与 pCMV-Myc 空载体表达产物发生免疫共沉淀(图 3, 泳道 1). 表明在 PC-12 细胞中 p75NTR 和 BFAR 蛋白确实存在特异性的相互作用.

## 2.4 p75NTR 和 BFAR 在 HeLa 细胞中的亚细胞共定位

用荧光共定位实验对 p75NTR 和 BFAR 各自在细胞内的定位情况进行了研究. 通过构建真核表达质粒 pEGFP-C1-BFAR 和 pEF-Flag-p75NTR, 并将两者分别单独转染 HeLa 细胞, 同时将它们做共转染. 对 p75NTR 蛋白转染组按免疫荧光定位的方法处理, 并用 Cy3 偶联红色荧光二抗标记, 在荧光共聚焦显微镜下观察定位情况. 结果显示, 单独转染时, GFP-BFAR 主要均匀地分布在细胞核外的细胞质内, 而 p75NTR 主要定位于细胞核外的细胞质及细胞膜上, 且细胞膜上分布较多; 而共转染时 p75NTR 和 BFAR 都能共同定位于细胞质, 表明 p75NTR 与 BFAR 存在空间上相遇和结合的可能性(图 4).

## 2.5 p75NTR 与 BFAR 相互作用对不同信号通路的影响

p75NTR 介导细胞凋亡的现象已经被广泛证实<sup>[2,3]</sup>. 此外, p75NTR 在调节细胞周期和β淀粉样蛋白形成方面发挥了关键的作用<sup>[4,5]</sup>. 大量研究表明, NFκB, JNK, p53 和神经酰胺等多种分子参与了 p75NTR 凋亡

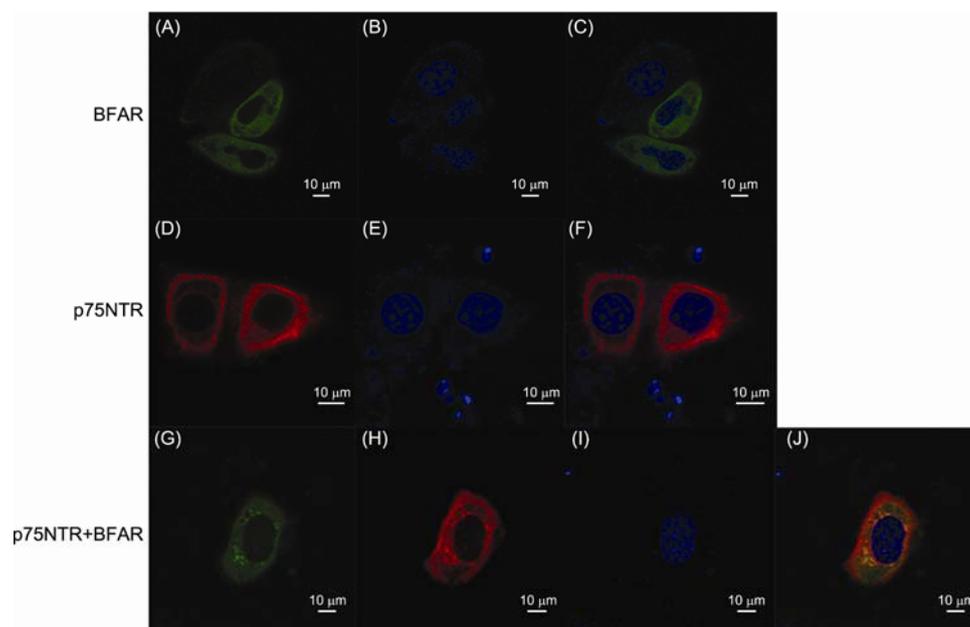


图4 p75NTR 和 BFAR 在 HeLa 细胞中的共定位图像

(A)~(C) pEGFP-C1-BFAR 单独转染 HeLa 细胞; (D)~(F) pEF-Flag-p75NTR 单独转染 HeLa 细胞后经红色荧光二抗标记; (G)~(J) pEF-Flag-p75NTR 和 pEGFP-C1-BFAR 共转染 HeLa 细胞

信号的转导<sup>[6-10]</sup>. BFAR 是双功能凋亡调节子蛋白<sup>[11]</sup>. 为了检测 BFAR 与 p75NTR 的相互作用是否会对 p75NTR 的凋亡信号转导产生影响, 选取 NFκB, JNK 信号通路为研究对象, 利用双荧光素酶检测系统分别在 PC-12 和 HEK293T 细胞体内检测 BFAR 对 4 种细胞内重要报告基因系统(表 2)的影响. 首先, 将 pCMV-Myc-BFAR 和 TP-rellina 内参分别与不同信号通路的报告质粒转染 PC-12 细胞, 同时转染空载体 pCMV-Myc 作为对照. 转染 48 h 后裂解细胞, 收集裂解液上清用冷光仪测定相对荧光素酶读数并与对照组相比. 结果显示, 在 PC-12 细胞中, 与对照组相比, 转染了 pCMV-Myc-BFAR 质粒后, NFκB, AP1, SRE 和 CRE 这 4 个信号通路活性都受到了不同程度的抑制, 荧光素酶的活性比单独转染 pCMV-Myc 分别下降了 48.67%, 31.41%, 22.19%和 28.04%(图 5(A)). 然后, 又将 pCMV-Myc-BFAR 和 pEF-Flag-p75NTR 共转染 HEK293T 细胞, 同时以空载体 pCMV-Myc 与 pEF-Flag-p75NTR 共转染作为对照. 结果显示, 与对照组相比, 在 BFAR 与 p75NTR 共转染的 HEK293T 细胞中 NFκB, AP1, SRE 和 CRE 这 4 个信号通路活性都受到不同程度的抑制(图 5(B)).

### 2.6 过表达 BFAR 对细胞周期的影响

曾有报道, 在 PC-12 细胞中抑制 p75NTR 的表达可导致细胞周期蛋白 D2(cyclin D2)表达上调<sup>[4]</sup>. 本研究也发现, 在 PC-12 细胞中过表达 BFAR 对多个信号通路都有不同程度的影响. 为了进一步分析 BFAR 对细胞周期的影响, 将 pCMV-Myc-BFAR 表达质粒和 pCMV-Myc 空载体分别转染 PC-12 细胞. 结果如图 6(A)所示, 转染 pCMV-Myc 空载体的 PC-12 细胞中 S, G2/M 和 G0/G1 期细胞占总细胞比例分别为 25.57%, 10.49%和 64.74%; 而转染了 pCMV-Myc-BFAR 的 PC-12 细胞中相应周期的细胞比例分别为 17.15%, 14.82%和 68.05%. 与空载体转染的对照组相比, BFAR 转染 PC-12 细胞后 S 期细胞数量减少了将近

表 2 双荧光素酶检测系统研究的 4 种信号通路

顺式增强作用元件	英文缩写	转录因子	信号转导通路
激活蛋白 1	AP1	c-jun/c-fos	JNK
核因子κB	NFκB	NFκB	NFκB
血清效应元件	SRE	Elk-1/SRF	MAPK/JNK
cAMP 反应元件	CRE	ATF2/CREB	JNK/p38&PKA

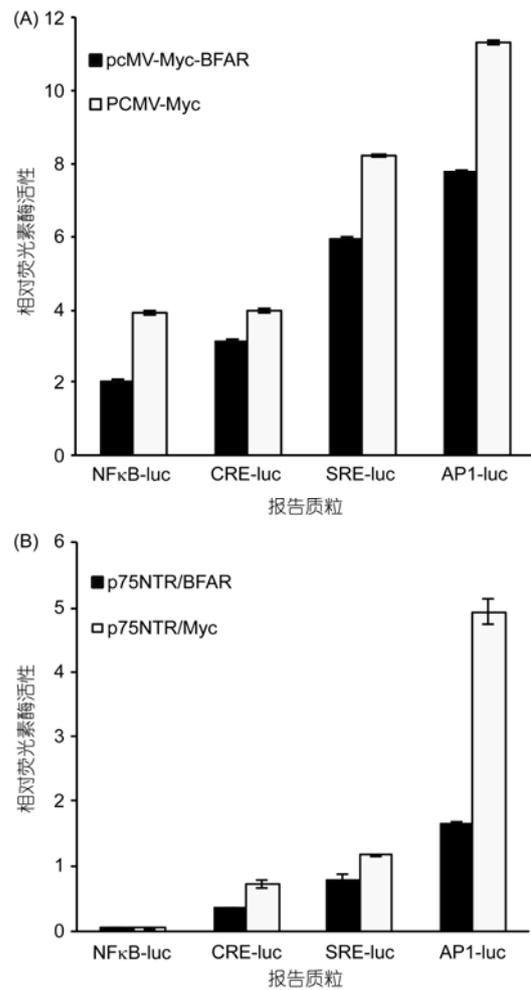


图 5 Luciferase 检测系统检测 BFAR 对信号通路的影响 (A) BFAR 单独转染 PC-12 细胞后对 4 种信号通路的影响; (B) p75NTR 与 BFAR 共转染 HEK293T 细胞后对 4 种信号通路的影响

1/4, G2/M 期细胞数增加了近 1/3, 而 G0/G1 期细胞数无显著差异. 又在 HEK293T 细胞中重复了上述实验, 也得到了相似的结果, 转染 pCMV-Myc 空载体后 S, G2/M 和 G0/G1 期细胞占总细胞比例分别为 37.85%, 22.19%和 59.96%; 转染 pCMV-Myc-BFAR 后各期比例分别为 28.71%, 28.82%和 42.47%(图 6(B)), 表明 BFAR 的过表达对细胞增殖具有一定的抑制作用.

### 3 讨论

神经生长因子低亲和力受体 p75NTR 是 I 型单跨膜蛋白, 广泛分布于神经系统及许多非神经系统的组织和肿瘤细胞中, 一般情况下 p75NTR 是低表达

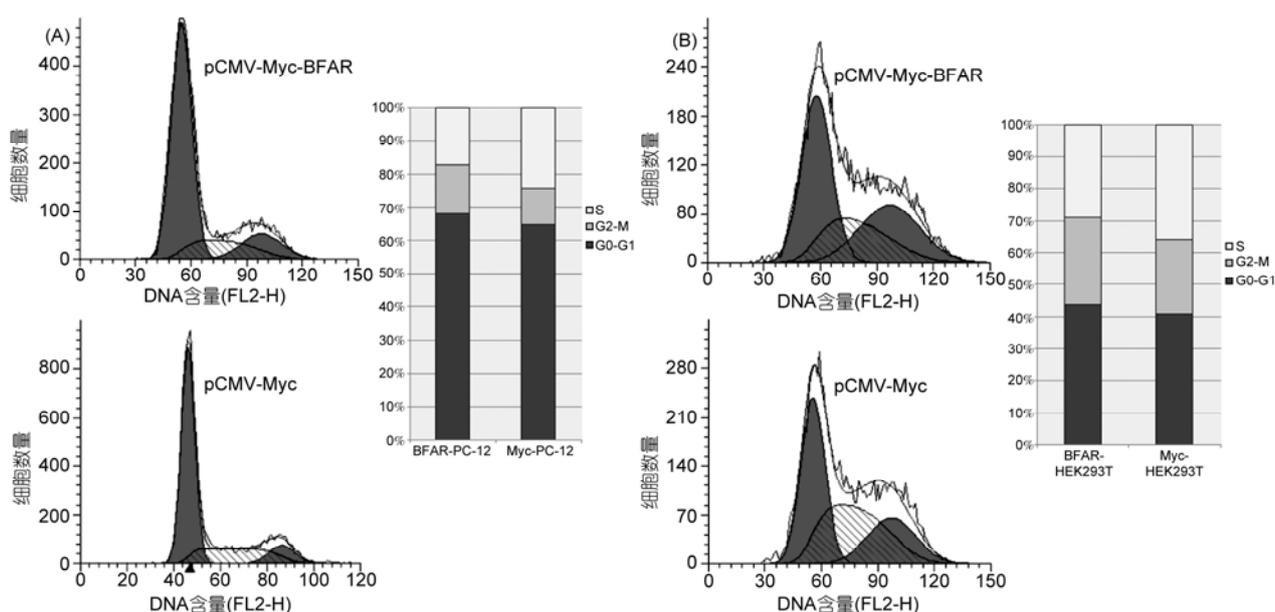


图6 流式细胞仪检测 BFAR 过表达对细胞周期的影响

(A) pCMV-Myc-BFAR 和空载体 pCMV-Myc 分别转染 PC-12 细胞; (B) pCMV-Myc-BFAR 和空载体 pCMV-Myc 分别转染 HEK293T 细胞

的, 当机体受到损伤时 p75NTR 上调表达. p75NTR 具有多样性的功能和复杂的信号转导途径, 参与促进神经细胞分化和调控细胞的存亡. p75NTR 死亡信号通路与人类神经退行性疾病有很大关联, 如老年性痴呆和运动神经萎缩症等都是与 p75NTR 高表达强烈相关的神经退行性疾病<sup>[12]</sup>. 从蛋白质相互作用的角度研究 p75NTR 在神经细胞生理病理过程中的功能及其调控的分子机制具有重要的意义.

酵母双杂交技术是研究活细胞内蛋白质相互作用的有效工具, 前人曾采用该技术鉴定出了多个与 p75NTR 相互作用的蛋白<sup>[13-15]</sup>. 然而传统的双杂交系统要求被研究的诱饵蛋白(Bait)和猎物蛋白(Prey)都必须是可溶性蛋白, 如果研究对象是膜蛋白时, 只能选择其胞内区或膜外区片段进行实验, 被捕获的目标蛋白也多是胞内可溶性的蛋白分子, 这极大地限制了其在膜蛋白相互作用研究中的应用.

DUALmembrane system 是瑞士 DUALsystem 公司根据 Johnsson N 和 Varshavsky A 发明的“分离的泛素”原理而研发的一种适用于研究膜蛋白相互作用的新型酵母双杂交系统<sup>[16]</sup>. 本研究首次采用该系统筛选人胎脑 cDNA 文库发现了一个新的 p75NTR 相互作用蛋白 BFAR, 并经 GST pull-down、免疫共沉淀 (CO-IP) 和亚细胞共定位等实验, 验证了它们在体内、

外相互作用的特异性.

BFAR 是最早由 Zhang 等人<sup>[17]</sup>发现的一种多结构域的蛋白, 它含有 450 个氨基酸, 包括 4 个可识别结构域: N 末端锌指结合 RING 环结构域, 可结合泛素连接酶 E2s; SAM 结构域, 能促进 Bcl-2 和 Bcl-XL 的相互作用, 抑制 Bax 诱导的细胞凋亡; DED 结构域, 与 procaspases-10 的死亡效应结构域 DEDs 序列同源, 有报道称其直接或间接与 caspase8 和 caspase10 前体相关, 阻碍 Fas 介导的凋亡信号通路; 以及 C 末端跨膜结构域 TM, BFAR 通过 TM 定位在内质网膜上. Roth 等人<sup>[11]</sup>研究发现, BFAR 的组织表达谱有高度特异性, 仅在脑组织中高表达. Rong 等人<sup>[18]</sup>发现, 延长内质网压力时间, 内源性 BFAR 表达水平将下降.

p75NTR 和 BFAR 都是膜整合蛋白, 其中 p75NTR 在内质网合成, 随后转移至质膜表面, 而 BFAR 主要分布在内质网, 少量分布在线粒体膜<sup>[11]</sup>. 因此, p75NTR 与 BFAR 的相互作用最有可能发生在内质网膜, 本文通过荧光共定位实验证实了两者可共定位于细胞质中. 流式细胞仪检测实验中发现共转染 p75NTR 和 BFAR 使细胞周期中 G2/M 期细胞数增加, S 期细胞数量减少.

Roth 等人<sup>[11]</sup>通过 CO-IP 证实 BFAR 能够与 HIP1, Hippi, Bap31 等发生相互作用, 这些蛋白都含有

pseudo-DED 结构域, p75NTR 也含有类似的 DD 结构域, 可能正是这个特殊的结构特征介导了 BFAR 和 p75NTR 间的相互作用. BFAR 能够抵抗凋亡发生, 而 p75NTR 是一个诱导细胞凋亡的 NGF 受体, 这种功能上的对抗性提示 BFAR 有可能抑制 p75NTR 介导的细胞凋亡. 曾有研究报道, NF $\kappa$ B 和 JNK 信号都与 p75NTR 介导的凋亡密切相关<sup>[6-9,19]</sup>. 本研究通过荧光素酶报告基因检测实验发现, 在 PC-12 和 293T 细胞中高表达 BFAR 都能够抑制 NF $\kappa$ B 和 JNK 相关的信号通路, 但 BFAR 对这些信号通路的抑制作用到底有何生理意义还有待进一步研究.

目前, 人们虽然对神经退行性疾病的病理学特征已有较多了解, 但有效的治疗方法还很有限, 这主要是由于对神经元细胞生存和死亡的分子调控机制尚未完全明了, 因此亟待加强对这方面的深入研究, 以便为寻找到新的治疗策略提供理论依据. 本研究首次发现并证实了两个功能拮抗的蛋白 BFAR 与 p75NTR 之间的特异性相互作用, 并对其生物学意义进行了初步探讨. 进一步深入研究它们之间的互作是如何介导与调控神经细胞自我保护的机制, 对于揭示神经元细胞生存和死亡的调控机制, 以及为神经退行性疾病的治疗提供新靶点和新思路将有重要的意义.

### 参考文献

- 1 Coulson E J, Reid K, Baca M, et al. Chopper, a new death domain of the p75 neurotrophin receptor that mediates rapid neuronal cell death. *J Biol Chem*, 2000, 275: 30537–30545
- 2 Rabizadeh S, Oh J, Zhong L, et al. Induction of Apoptosis by the low-affinity NGF receptor. *Science*, 1993, 261: 345–348
- 3 Salehi A H, Roux P P, Kubu C J, et al. NRAGE, a novel MAGE protein, interacts with the p75 neurotrophin receptor and facilitates nerve growth factor-dependent apoptosis. *Neuron*, 2000, 27: 279–288
- 4 Fritz M D, Mirnics Z K, Nylander K D, et al. p75NTR enhances PC-12 cell tumor growth by a non-receptor mechanism involving downregulation of cyclin D2. *Exp Cell Res*, 2006, 312: 3287–3297
- 5 Wang Y J, Wang X, Lu J J, et al. p75NTR regulates Abeta deposition by increasing Abeta production but inhibiting Abeta aggregation with its extracellular domain. *J Neurosci*, 2011, 31: 2292–2304
- 6 Carter B D, Kaltschmidt C, Kaltschmidt B, et al. Selective activation of NF-kappa B by nerve growth factor through the neurotrophin receptor p75. *Science*, 1996, 272: 542–545
- 7 Khursigara G, Orlinick J R, Chao M V. Association of the p75 neurotrophin receptor with TRAF6. *J Biol Chem*, 1999, 274: 2597–2600
- 8 Bhakar A L, Howell J L, Paul C E, et al. Apoptosis induced by p75NTR overexpression requires Jun kinase-dependent phosphorylation of Bad. *J Neurosci*, 2003, 23: 11373–11381
- 9 Yoon S O, Bonnefil C P, Carter B, et al. Competitive signaling between TrkA and p75 nerve growth factor receptors determines cell survival. *J Neurosci*, 1998, 18: 3273–3281
- 10 Gentry J J, Bonnefil C P, Carter B D. Nerve growth factor activation of nuclear factor kappa B through its p75 receptor is an anti-apoptotic signal in RN22 schwannoma cells. *J Biol Chem*, 2000, 275: 7558–7565
- 11 Roth W, Kermer P, Krajewski M, et al. Bifunctional apoptosis inhibitor (BAR) protects neurons from diverse cell death pathways. *Cell Death Differ*, 2003, 10: 1178–1187
- 12 Dechant G, Barde Y A. The neurotrophin receptor p75<sup>NTR</sup>: novel functions and implications for diseases of the nervous system. *Nat Neurosci*, 2002, 5: 1131–1136
- 13 Mukai J, Hachiya T, Hoshino S S, et al. NADE, a p75NTR-associated cell death executor, is involved in signal transduction mediated by the common neurotrophin receptor p75NTR. *J Biol Chem*, 2000, 275: 17566–17570
- 14 Bai D, Chen H, Huang B. RanBPM is a novel binding protein for p75NTR. *Biochem Biophys Res Commun*, 2003, 309: 552–557
- 15 Nichols A, Martinou I, Maundrell K, et al. The p75 neurotrophin receptor: effects on neuron survival *in vitro* and interaction with death domain-containing adaptor proteins. *Apoptosis*, 1998, 3: 289–294
- 16 Johnsson N, Varshavsky A. Split ubiquitin as a sensor of protein interactions *in vivo*. *Proc Natl Acad Sci USA*, 1994, 91: 10340–10344
- 17 Zhang H, Xu Q, Stanislaw K, et al. BAR: an apoptosis regulator at the intersection of caspases and Bcl-2 family proteins. *Proc Natl Acad Sci USA*, 2000, 97: 2597–2602
- 18 Rong J, Chen L L, Toth J I, et al. Bifunctional apoptosis regulator(BAR), an endoplasmic reticulum (ER)-associated E3 ubiquitin ligase, modulates BI-1 protein stability and function in ER stress. *J Biol Chem*, 2011, 286: 1453–1463
- 19 Ye X, Mehlen P, Rabizadeh S, et al. TRAF family proteins interact with the common neurotrophin receptor and modulate apoptosis induction. *J Biol Chem*, 1999, 274: 30202–30208